

多肽类药物分析方法探究  
**Studies on Analytical Methods for Peptide Drugs**

岛津(上海)实验器材有限公司  
Shimadzu (Shanghai) Global Laboratory Consumables Co.,Ltd.

涂奇奇

# 关于多肽的定义

## ➤ 对于“肽”和“蛋白质”的界定在某些方面尚无科学共识 (FDA)

Final rule: Definition of the Term “Biological Product”, FDA, FDA-2018-N-2732-0091

根据最终规则, 术语“蛋白质”是指具有特定定义序列且大小大于40个氨基酸的任何 $\alpha$ 氨基酸聚合物。

具体而言, 拟议规则将“蛋白质”解释为“具有大于40个氨基酸大小的特定定义序列的任何 $\alpha$ 氨基酸聚合物”, 将“化学合成的多肽”解释为“具有以下特征的任何 $\alpha$ 氨基酸聚合物: ①完全通过化学合成制成的; ②大小大于40个氨基酸, 但小于100个氨基酸。”

## ➤ 关于多肽的不同定义 (未明确共识)

- 多肽一般指由3-50个 $\alpha$ 氨基酸脱水缩合形成的一类化合物
- 通常由10-100个氨基酸分子脱水缩合而成的化合物叫多肽
- 多肽通常指不超过50个氨基酸构成的肽链, 介于小分子化药 (分子量5000) 之间

□ 2个氨基酸相连即为肽, 小于100个氨基酸即为我们讨论的多肽, 许多药物多肽介于10-100个氨基酸分子间

药物	分子量	活性	特异性	免疫原性	纯度	成本
化学药	≤500	较低	弱	无	不绝对	低
多肽药	500-10000	高	强	低或无	不绝对	高
蛋白药	≥10000	高	强	有	不绝对	更高

## 关于多肽的研究概况

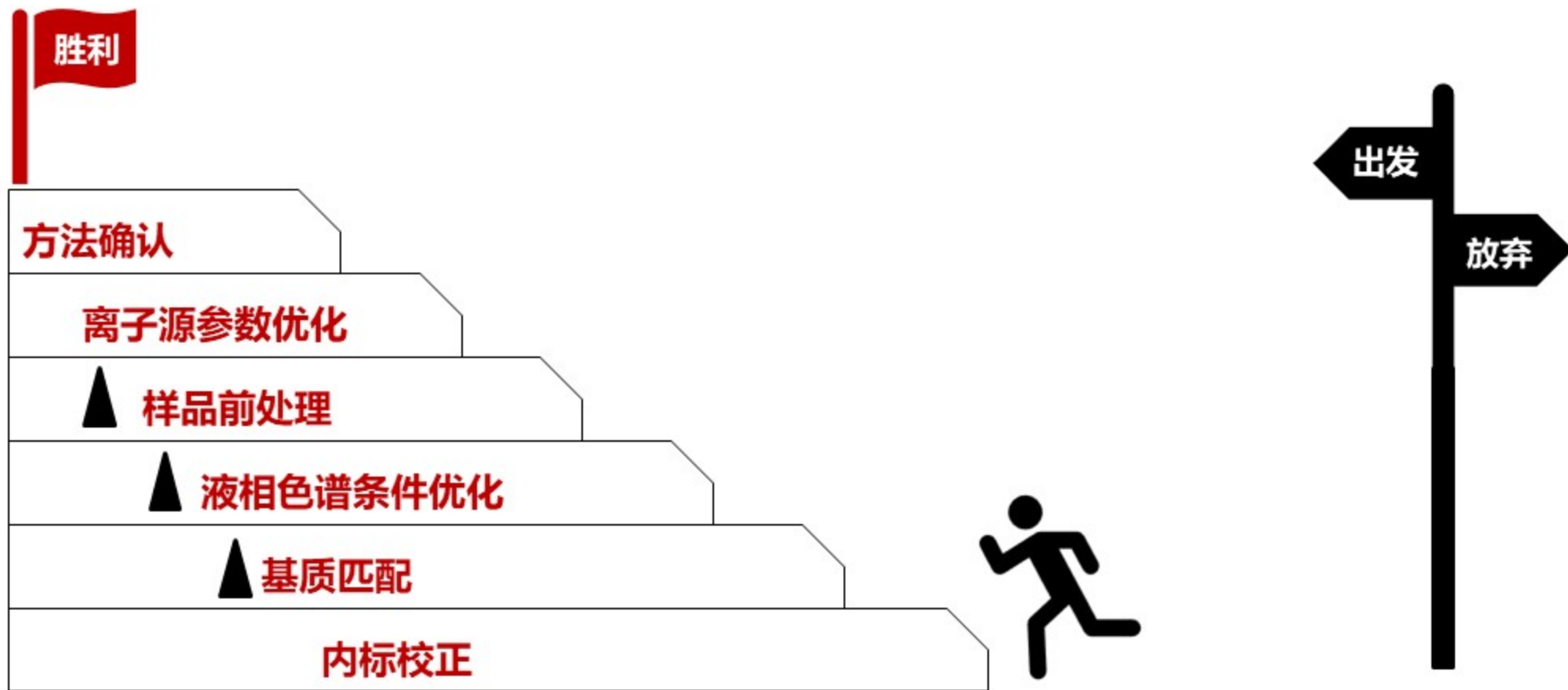
- 有约500多个多肽产品在全球进入开发阶段，约73个多肽产品在美国和其他国家获批，150多种多肽在临床阶段，近一半在临床二期。（Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions）
  - 据相关调查机构，2018年多肽市场近285亿，到2025年将期望近420亿。
  - 所研发的多肽长度在80年代早期主要以不超过10个氨基酸为主，现在平均长度在后面的几十年里有所增加，许多趋向于40个氨基酸、甚至更长。
  - 同时，修饰化的、融合多肽的研究也在增长
  - 肿瘤抗原肽的寻找也已成为当前肿瘤研究领域的一大热点
  - 新的肽药物递送、剂型和半衰期延长方法将进一步推动这一独特种类的药物的发展。

商品名	通用名	厂家	给药方式	半衰期	肽大小
百泌达	艾塞那肽	礼来	皮下	2-2.4h	39
诺和力	利拉鲁肽	诺和诺德	皮下	10-14h	31
复泰奥	特立帕肽	礼来	皮下	0.5h	34
密盖息	鲑鱼降钙素	诺华	皮下或肌注	1-1.5h	32

# 多肽-LCMSMS分析中的主要难点



# 方法开发逻辑流程



# 基质效应的校正

**工作曲线  
(基质匹配)**

稳定统一的空白基质难以获得  
不同样品间基质存在差异

**标准加入法**

样品基体成分高且变化不定  
耗时，工作量大，不适合大批量

**内标  
Internal  
standard**

同位素标记物  
结构性质类似的化合物  
(响应性能，色谱行为等)

# 标准品及同位素内标



**现货库存  
+  
定制合成**

项目
特立帕肽
丙氨瑞林
艾塞那肽
利拉鲁肽
亮丙瑞林
索马鲁肽
多柔比星
更多大分子定制服务.....

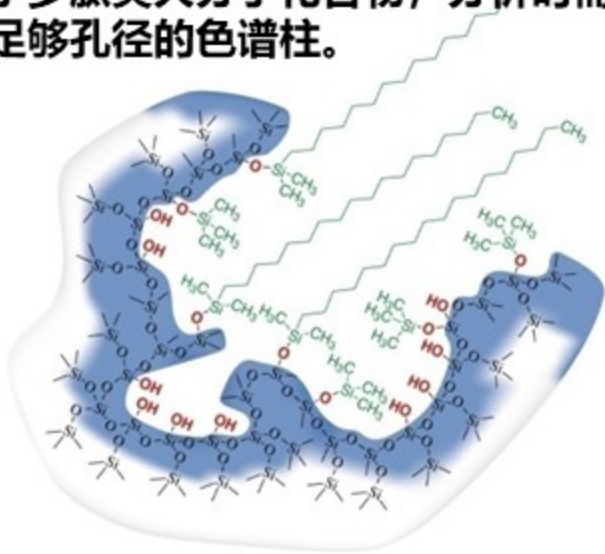
- $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 同位素内标
  - 纯度 > 99%
  - 避免氘氢交换，尤其是疏水性氘代化合物，影响定量准确度
- 更全面的COA报告
  - 详细的HPLC、NMR和MS谱图数据
  - 提供保质期信息
  - 定期更新COA报告
- 粉末形式，稳定性更强，长期保存条件为 $-20^{\circ}\text{C}$
- 百万分之一天平精准称量
- 部分独家同位素内标

# 分子量与孔径

- 待测分子与键合相的相互作用主要发生在硅胶筛孔内。

因此待测分子是否能进入筛孔内，以及是否有足够的空间与筛孔内的键合相产生吸引就显得尤为重要！

- 对于多肽类大分子化合物，分析时需要选择足够孔径的色谱柱。



名称	拓扑极表面积Å <sup>2</sup>	理论回旋半径Å	建议最小孔径直径Å
利拉鲁肽	1510.0	29.5	117.9
艾塞那肽	1780.0	32.9	131.6
特立帕肽	1750.0	32.3	129.4
亮丙瑞林	469.0	9.5	38.0
门冬胰岛素	2500.0	45.8	183.1

商品名	通用名	肽大小
百泌达	艾塞那肽	39
诺和力	利拉鲁肽	31
复泰奥	特立帕肽	34
密盖息	鲑鱼降钙素	32

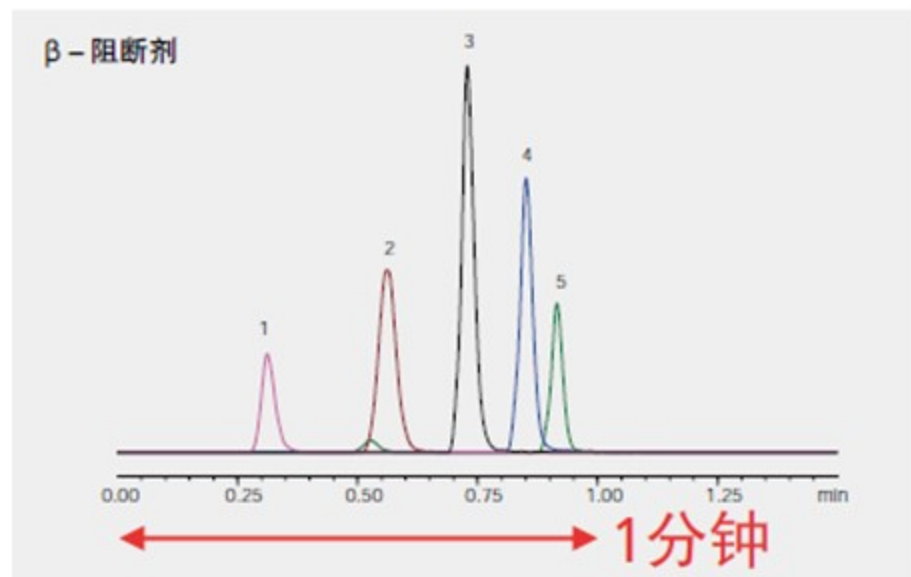


# 传统孔径VS 放大孔径



GISS C18

孔径增大  
惰性化硅胶  
低含碳量  
聚合物包被技术



■ 样品 (每 100 μg/L)

峰号	保留时间 (min)	峰面积
1. 酮丁洛尔	337.10	> 116.05 (+)
2. 阿替洛尔	267.25	> 145.00 (+)
3. 拉贝洛尔	329.00	> 161.95 (+)
4. 康格尔	310.05	> 254.00 (+)
5. 哌唑洛尔	249.80	> 116.00 (+)

Q1 > Q3

■ Conditions

Column	: Shim-pack GISS C18 (50 mmL × 2.1 mmI.D., 1.9 μm) (P/N: 227-30048-01)
Mobile Phase	: A) 10 mmol/L Ammonium formate in Water B) 10 mmol/L Ammonium formate in Methanol A/B = 70/30 - 0.3 min - 40/60 - 0.5 min - 0/100 - 0.1 min - 0/100 - 0.01 min - 70/30 - 0.5 min - 70/30 (w/v)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Col. Temp.	: 40 °C
Detection	: LC/MS/MS (ESI, Positive, Negative MRM)

键合相	十八烷基
粒径	1.9 μm, 3 μm, 5 μm
孔径	20 nm
比表面积	200 m <sup>2</sup> /g
含碳量	9 %
端基封尾	完全
pH 范围	1 - 10
USP 分类	L1

# PEEK内衬不锈钢管技术

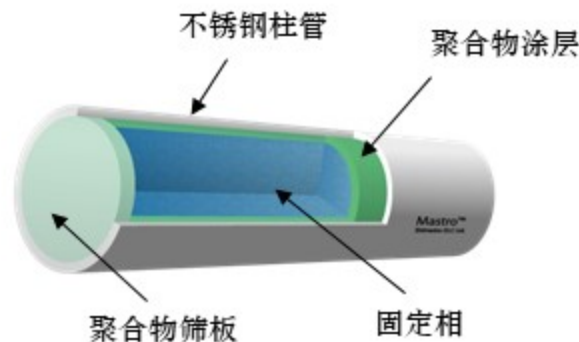
## 改善配位型化合物峰型的色谱柱!

- PEEK内衬不锈钢管, 更高惰性, 防止配位性化合物吸附, 主要用于含有磷酸基团等配位性化合物样品分析!
- 宽pH值1-10, 耐100%纯水流动相, 苛刻的流动相条件下优异的耐久性!
- 更高效, 适合UHPLC快速分离, 低流失, 适合用于LC/MS(/MS)高通量分析!

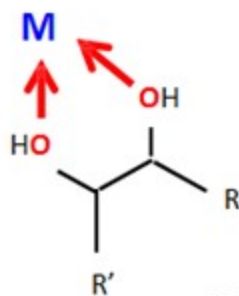
## 目标: 易与金属离子形成螯合物的化合物

- 核苷酸 (ATP, ADP, AMP, GMP, UDP, CTP 等)
- 磷酸化糖
- 药物代谢产物
- **蛋白, 多肽**
- 真菌毒素 (伏马毒素)

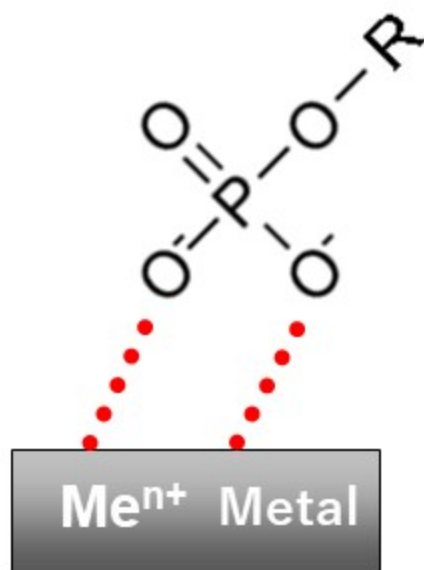
惰性



## GISS C18 (metal free)

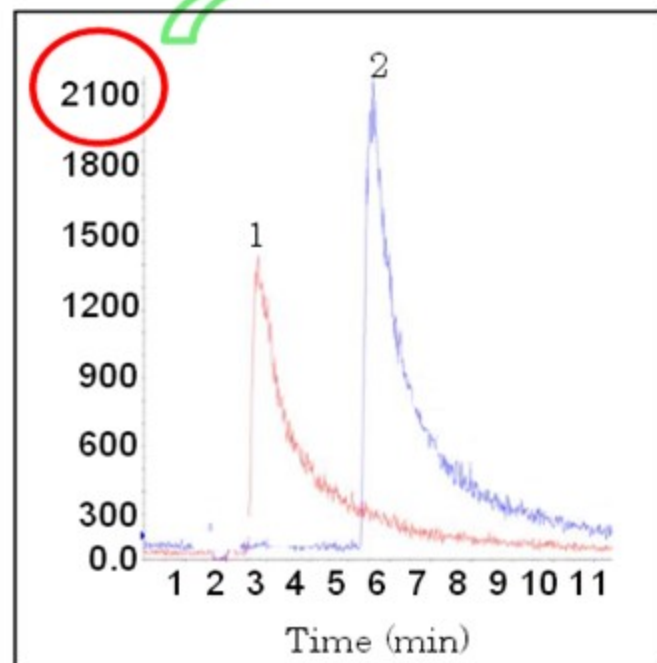


M: 金属原子



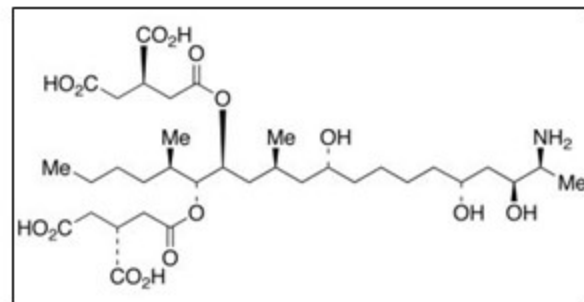
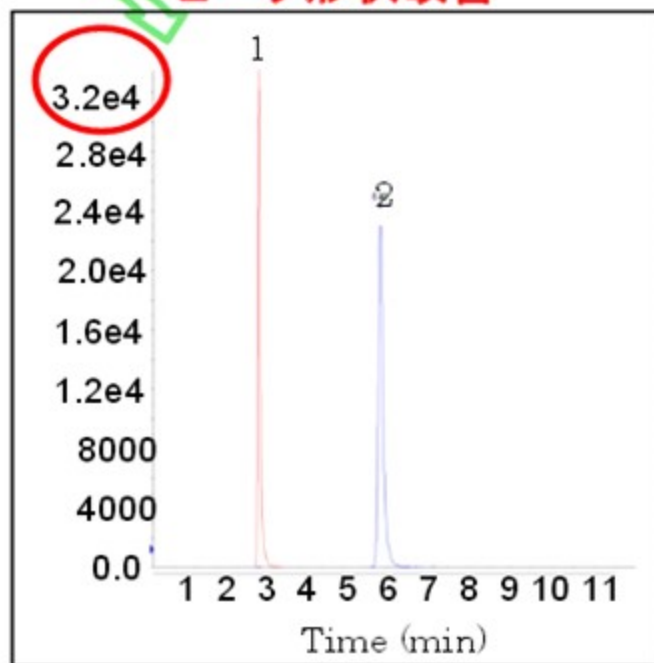
# Shim-pack GISS C18 (metal free)分析伏马毒素

## SUS



## PEEK

感度UP  
ピーク形状改善

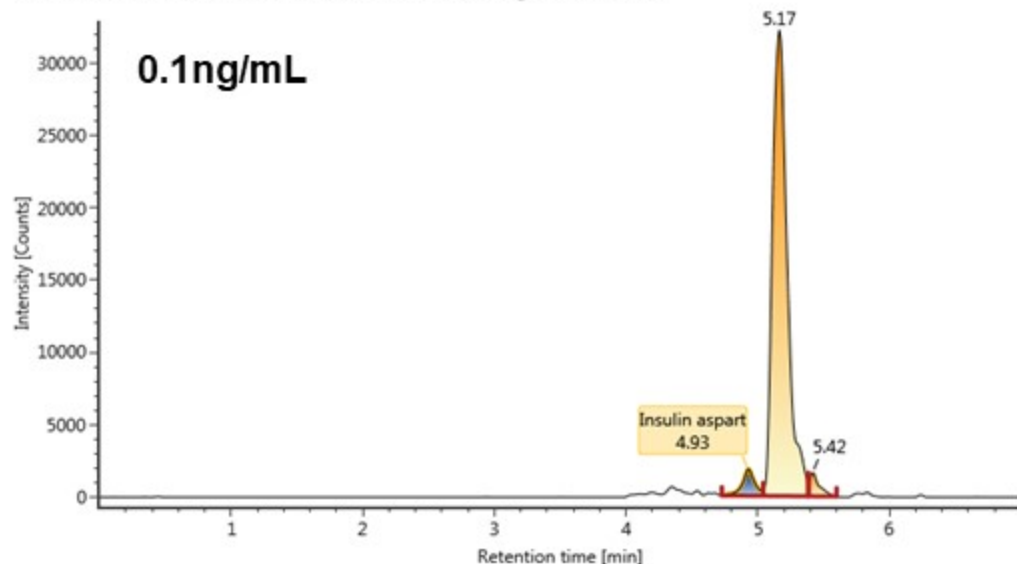


伏马毒素

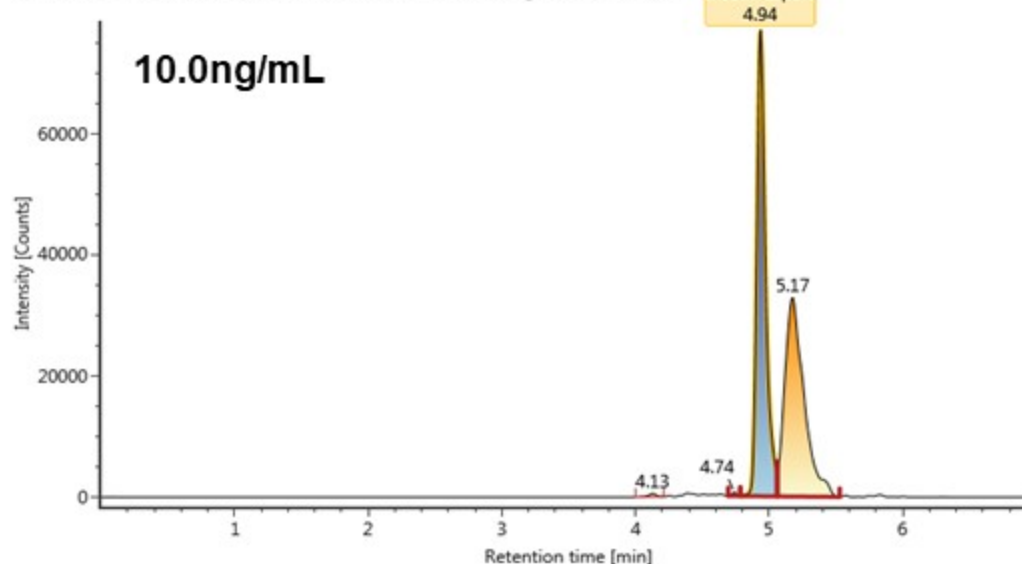
Shim-pack GISS C18, (metal free) .....  
 A) 0.1 % HCOOH, 10 mM HCOONH<sub>4</sub>  
 B) CH<sub>3</sub>CN  
 A/B = 60/40, v/v  
 0.2 mL/min  
 40 °C  
 LC/MS/MS (ESI, Positive, MRM)  
 1. Fumorisin B1 (Q1/Q3 = 722/334)  
 2. Fumorisin B2 (Q1/Q3 = 706/336)

# Shim-pack GISS C18 (metal free)分析门冬胰岛素

Item name: MeOH:ACN=1:1-STD01  
Channel name: 3: Quad MRM 971.87>1,146.20 18eV ESI+ : Integrated : Smoothed

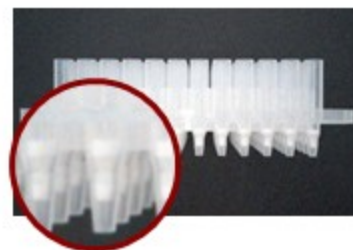


Item name: MeOH:ACN=1:1-STD08  
Channel name: 3: Quad MRM 971.87>1,146.20 18eV ESI+ : Integrated : Smoothed



Mobile phase: Mobile Phase A: Water:Formic acid, 1000:1, v/v  
Mobile Phase B: Acetonitrile:Formic acid, 1000:1, v/v

Time(min)	%A	%B	Flow (mL/min)
0.00	80	20	0.3
1.00	80	20	0.3
3.00	65	35	0.3
4.01	5	95	0.3
5.50	5	95	0.3
5.51	80	20	0.3
7.00	80	20	0.3



380-00745-01  
SHIMSEN micro-SPE-SAX



227-30924-02  
Shim-Pack GISS C18 (metal free)

## 更多选择-色谱柱

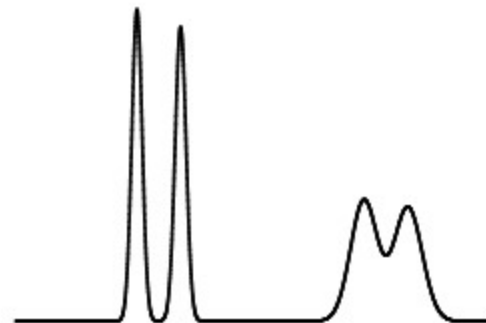
系列名称	特点	可选规格
Shim-Pack GISS	采用惰性化硅胶，同时采用聚合物包被技术和大孔径工艺，并结合peek内衬管，以满足分析需求。	Shim-pack GISS C18
		Peek内衬 Shim-pack GISS C18 (metal free)
SHIMSEN Ankylo	通过优化的表面键合密度、更均一的填料粒径大小，在保证高分离度的前提下，化合物洗脱更快，分析效率更高； 多种键合相、多种孔径规格可选； <b>最优性价比之选。</b>	SHIMSEN Ankylo C18-300 (孔径300Å)
		SHIMSEN Ankylo C8-300 (孔径300Å)
		SHIMSEN Ankylo C4-300 (孔径300Å)
		SEC、IEX、HIC系列生物药色谱柱
Shim-Pack Scepter	硅胶表面采用有机杂化颗粒技术，使之具备高惰性、高稳定性，有效改善峰型，可耐受温度最高至90°C，可耐受碱性pH最高至1-10。	分析柱 Shim-pack Scepter C4-300 (孔径300Å)
		制备柱 Shim-pack Scepter C4-300 (孔径300Å)
		保护柱 Shim-pack Scepter C4-300 (孔径300Å)

## 液相色谱条件优化

液相色谱  
条件优化

液相色谱分析三要素，分别为分离度、灵敏度、重现性

流动相可从梯度条件、缓冲盐浓度、pH值三个维度进行调整



分离度计算公式

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) (\alpha - 1) \sqrt{N} [K / (K + 1)]$$

N: 柱效 (Efficiency)

 $\alpha$ : 选择性 (Selectivity)

K: 容量因子 (Capacity)

流动相

等度&amp;梯度

缓冲盐浓度

pH值

## 前处理



# 为什么？

下。

多肽类、蛋白类待测物回收率总是低

# 前处理-沉淀损失



前处理的每一步都可能引起回收率低下

- 多肽类、胰岛素类许多物理化学行为与血液中的大多数蛋白一致，主要差异在于分子量、氨基酸序列的不同。
- 因此在进行蛋白沉淀时，该类物质极有可能与其他蛋白共同形成沉淀，或是被包被于沉淀蛋白中，从而通过“蛋白沉淀”这一步骤造成损失。

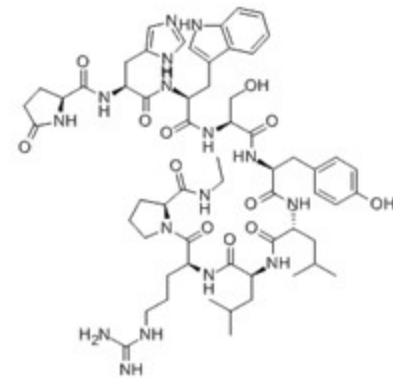
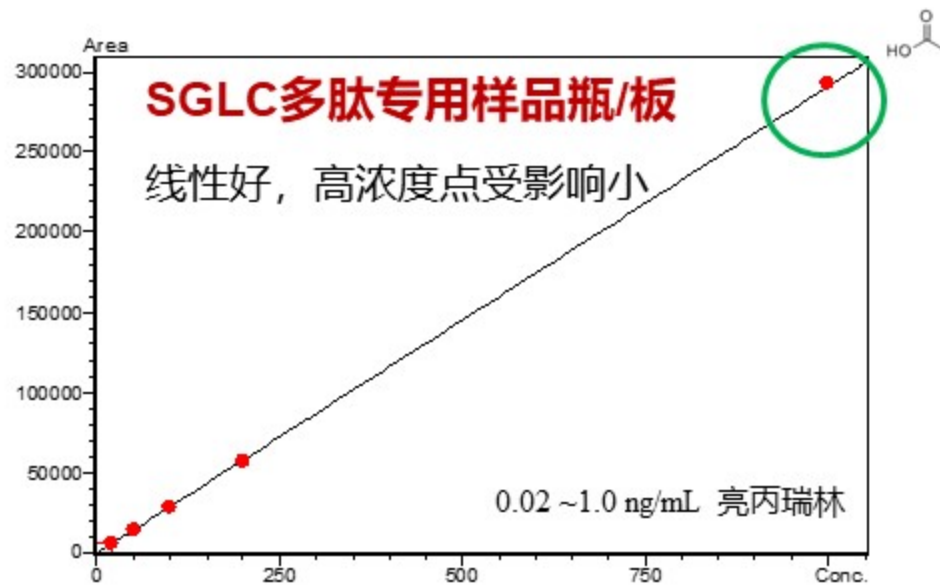
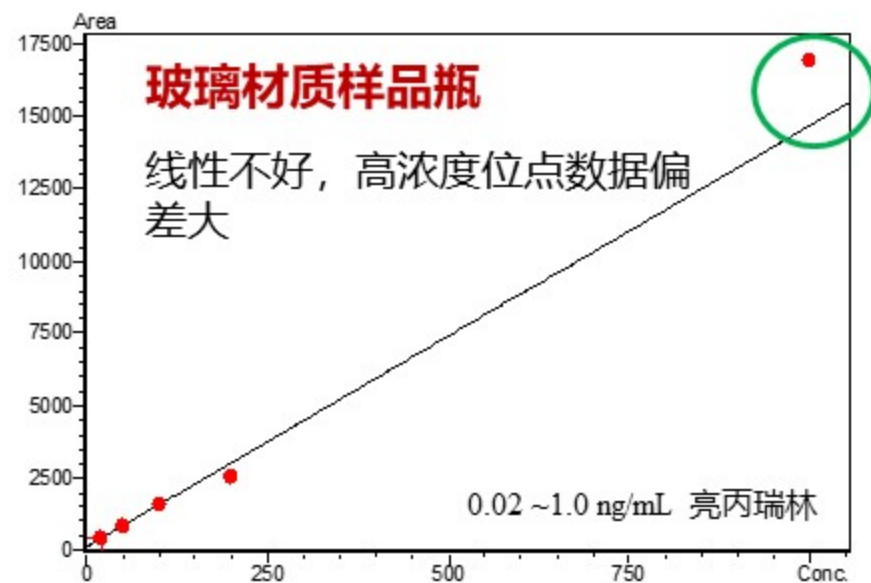


# 前处理-吸附损失

- **多肽不稳定性的潜在原因**
- 脱酰胺反应（非酶催化，与本所结果和环境条件有关）
- 被氧化（受温度、氧分压、缓冲溶液响应）
- 水解（肽键水解）
- 二硫键错配
- 消旋（碱性pH下易发生）
- $\beta$ -消除（碱性pH下易发生）
- 变性、**吸附**、聚集、沉淀（大部分多肽容易发生吸附现象）

## SHIMSEN 低吸附样品瓶/板

## 多肽类碱性物质亮丙瑞林



380-00813  
2.0mL 圆孔样品板

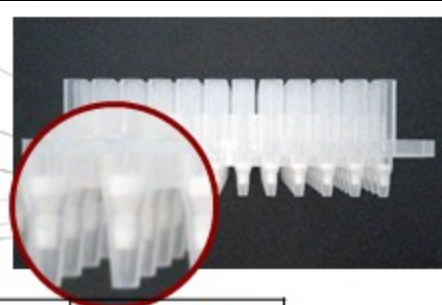
样品板	多肽类物质	信号响应
玻璃材质	1.0ng/mL	1.70E+04
SGLC多肽专用	1.0ng/mL	2.45E+04

使用玻璃材质样品瓶存在吸附导致的峰面积低、线性差等问题，使用多肽专用样品瓶可以避免**31%**的吸附浓度，从而保障线性相关度及实验结果稳定可靠

# 前处理-氮吹损失

- **氮吹复溶过程中导致回收率低下的原因**
- **样本吹离**-部分多肽或蛋白类药物结构呈片状或羽毛状，在氮吹过程中容易被吹离储存容器
- **强化吸附**-在室温下多肽或蛋白类药物在存储容器上有较弱吸附，在氮吹过程中高温、高浓缩使得吸附现象严重加剧，尤其是长时间较高温度的氮吹
- **复溶效率低下**-在存在部分吸附的情况下，如果复溶溶剂选择不合理、复溶时间过短、复溶涡旋覆盖面不足，往往会导致更高的损失

## SHIMSEN micro-SPE-WCX分析儿茶酚胺



## 儿茶酚胺 SHIMSEN micro-SPE-WCX 380-00843-31

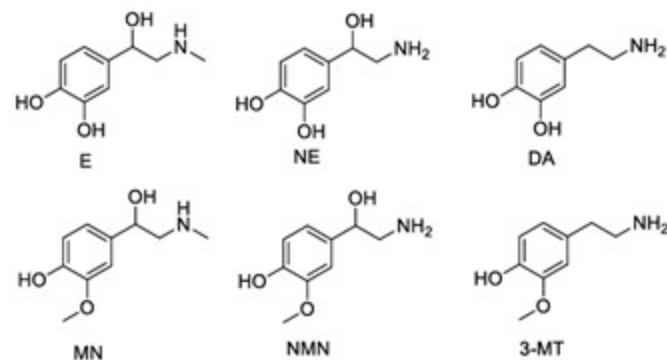
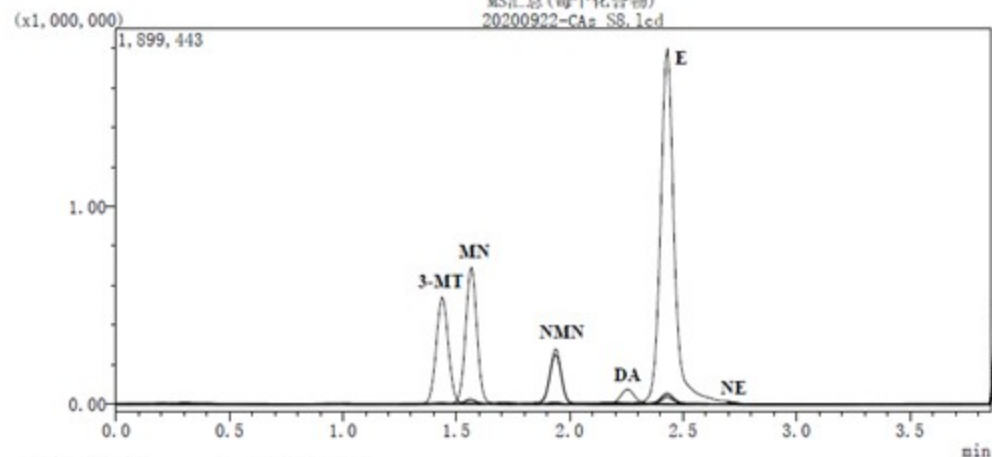


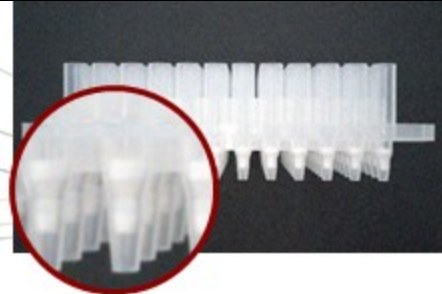
图1 儿茶酚胺及其代谢物结构式

MS汇总(每个化合物)  
20200922-CAz\_SS\_1.cad

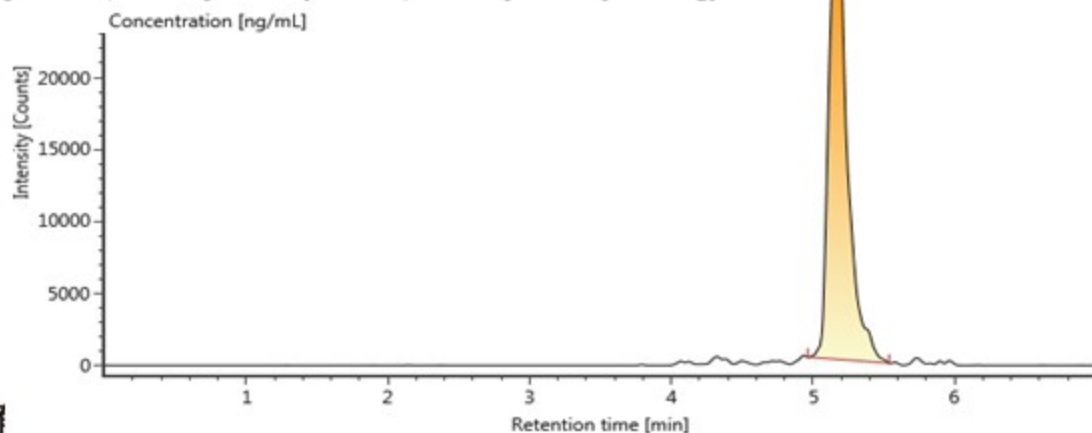
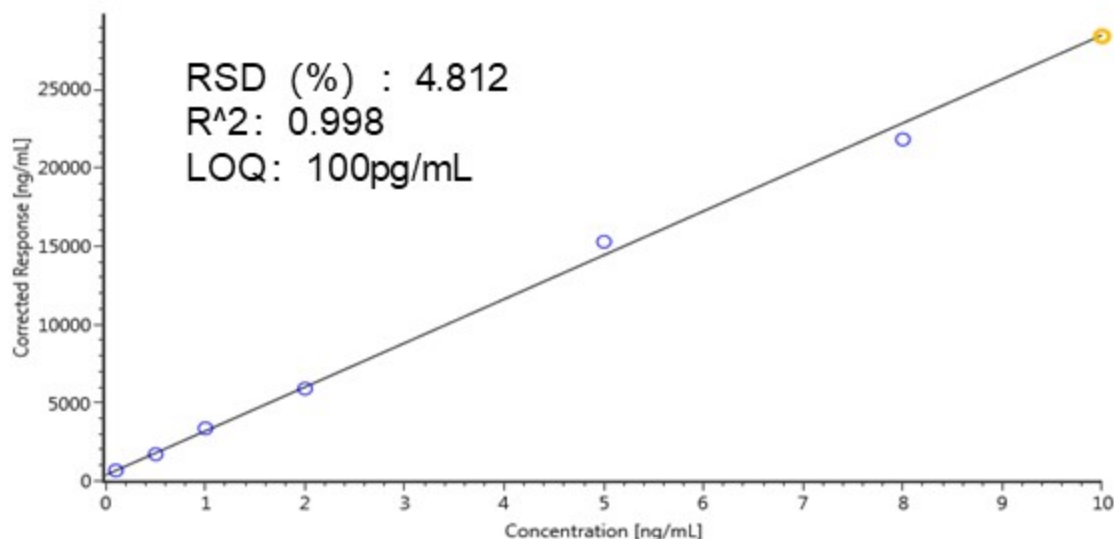
定量限 (nmol/L)	A产品	P产品	SHIMSEN
多巴胺	0.0625	0.0325	0.0125
肾上腺素	0.100	0.100	0.100
去甲肾上腺素	0.100	0.060	0.100
变肾上腺素	0.100	0.050	0.050
变去甲肾上腺素	0.100	0.025	0.050
3-甲氧酪胺	0.050	0.060	0.050
实际做样问题	1、多巴胺无数据 2、偶尔发生血浆过滤不下去的情况		不同板子之间 批次效应明显 重现性及可操作性良好

名称	浓度	单位	精密度%
DA m/z: 154.05>91.10	13.004	pg/mL	89.6
E m/z: 183.90>166.05	25.365	pg/mL	102.5
NE m/z: 151.90>107.10	45.238	pg/mL	90.8
3-MT m/z: 151.00>119.10	4.617	pg/mL	104.9
NMN m/z: 198.15>148.15	20.375	pg/mL	96.2
MN m/z: 166.10>134.10	21.985	pg/mL	101.0

## SHIMSEN micro-SPE-SAX分析门冬胰岛素



## 门冬胰岛素 SHIMSEN micro-SPE-SAX 380-00842-31



检测位点	检测浓度	K理论浓度	精密度
STD01	0.101	0.1	101%
STD03	0.471	0.5	94%
STD04	1.058	1	106%
STD05	1.963	2	98%
STD06	5.302	5	106%
STD07	7.63	8	95%
STD08	9.973	10	100%

## 380-00745-01 SHIMSEN micro-SPE-SAX

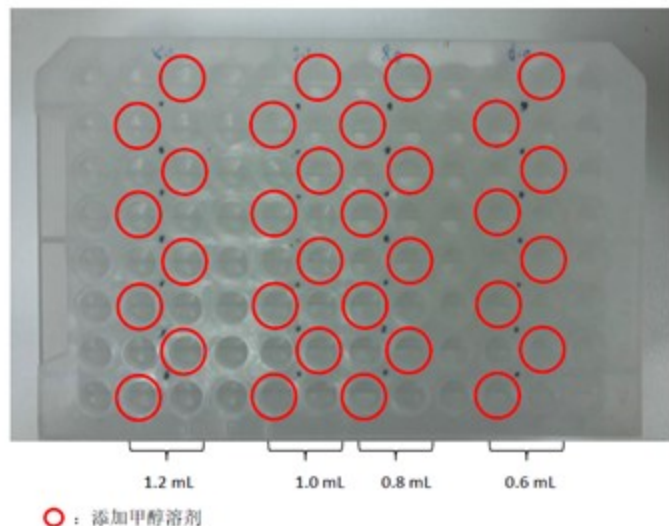
Condition: 200  $\mu$ L methanolEquilibrate: 200  $\mu$ L waterLoad Entire diluted PPT supernatant was loaded onto the sample: extraction plate into two steps of approximately 500  $\mu$ L eachWash: 200  $\mu$ L 5% NH<sub>4</sub>OH in waterWash: 200  $\mu$ L 5% methanol + 1% acetic acidElute: 2  $\times$  25  $\mu$ L 60:30:10, methanol/water/acetic acidDilute: 50  $\mu$ L waterInject: 15  $\mu$ L

# 更多选择-前处理

分类		系列名称
SPE	中性物质	Panthera Deluxe DVB (同HLB) /SHIMSEN <b>micro-SPE</b> DVB
	弱酸物质	Agility Deluxe SAX/SHIMSEN <b>micro-SPE</b> SAX
	弱碱物质	Agility Deluxe SCX
	强酸物质	Agility Deluxe WAX
	强碱物质	Agility Deluxe WCX/SHIMSEN <b>micro-SPE</b> WCX
蛋白沉淀		RubyPro
<b>磷脂去除</b>		MatriKleen Plate
超效过滤		PVDF filter plate / PP filter plate
固液萃取 <b>SLE</b>		Aquamatrix SLLE
<b>空板</b>		360uL/1mL/2mL 尖底&圆底, 硅胶盖垫, 锥底板, 低吸附系列

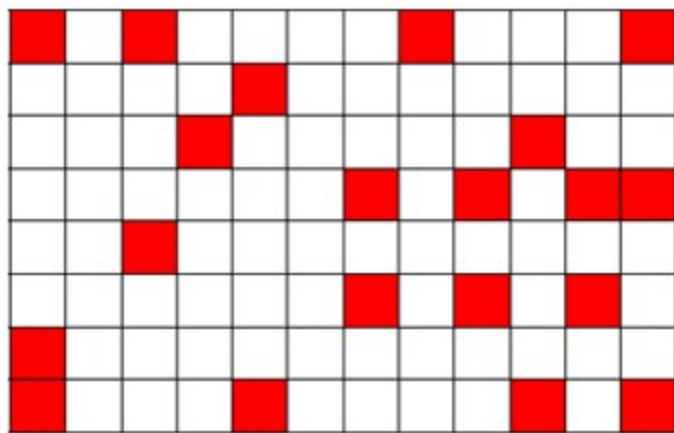
# SHIMSEN 空板及盖垫 · 密闭性极佳，液液萃取优选

## 涡旋测试数据



甲醇溶液	1.2mL	1.0mL	0.8mL	0.6mL
500 r/min	未泄露	未泄露	未泄露	未泄露
1000 r/min	未泄露	未泄露	未泄露	未泄露
1500 r/min	未泄露	未泄露	未泄露	未泄露
2000 r/min	未泄露	未泄露	未泄露	未泄露
2500 r/min	未泄露	未泄露	未泄露	未泄露

## 进针测试数据



选取SHIMSEN系列360 uL、1.0 mL、2.0 mL三种规格的96孔板及对应盖垫各3块，在不同点位进行连续进样测试。结果表明，3种规格的96孔板在进样过程中均未出现盖垫被进样针带起的现象，仪器未出现进样异常报警，盖垫匹配度良好。

# 多肽-LCMSMS分析中的主要难点



## 总结

### 液相分离

#### 吸附问题

多肽类待测物除本身由于碱性因素会与填料相互作用外，还可能与柱管内壁金属形式螯合而引起吸附。根据实际情况选择是否用peek内衬的色谱柱。

#### 分离问题

当待测分子能很好的进入填料孔径才能达到应有的分离效果，因此根据分子量、流体力学半径选择更合适的孔径的色谱柱。（200A-300A）

### 标曲建立

#### 低、高点偏差

多肽类及碱性药物往往容易在存储容器上产生吸附，因此选择更低吸附的存储容器可有效改善该问题。

#### 内标偏差

采用同位素内标可以有效避免相似物内标在物理化学行为上的差异。

### 前处理

#### 回收率低

**沉淀损失**-多肽类容易在“蛋白沉淀”中与样本内其他蛋白共沉淀而损失，可考虑优化沉淀剂（乙腈）或者沉淀手段（蛋白沉淀板）来减低损失。

**吸附损失**-采用惰性材料（低吸附96孔板）、表面活性剂（吐温20）、预饱和（血清预润）等手段来避免吸附、聚集所造成的损失。

#### 操作耗时

**氮吹损失**-采用低温氮吹浓缩+低吸附96孔板，或离心浓缩，或micro-SPE避免氮吹操作，验证、优化复溶溶剂来减低该步骤的损失。



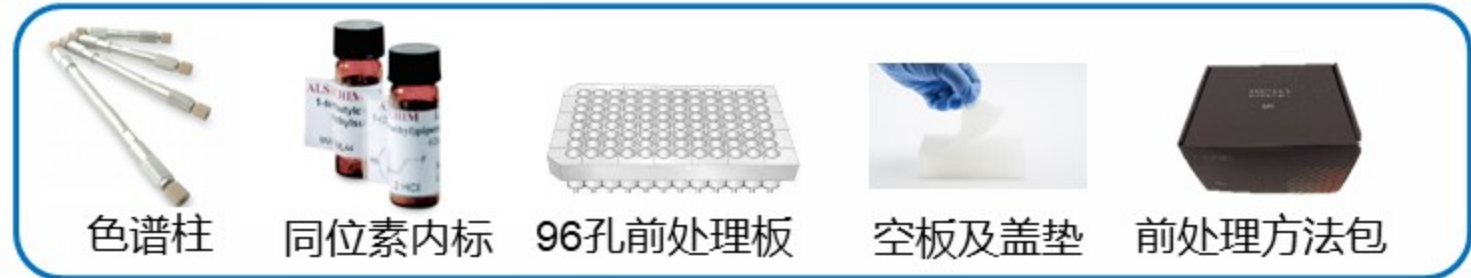
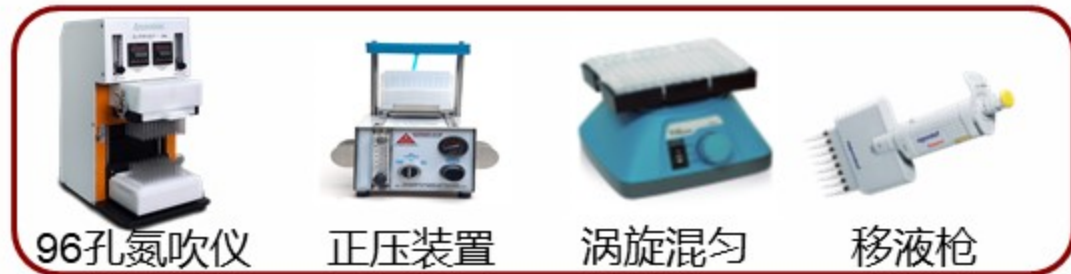


**第一步**

初建实验室

**第二步**

持续支持



- 欢迎各位有想法的老师联合开发创新产品!
- 涂奇奇 15026778119

脂质体作为药物载体是临床应用较早，发展最为成熟的一类新型靶向制剂，目前应用十分广泛。但是，准确测量游离药物浓度及脂质体浓度是目前面临的**最大困难**。

传统的方法是采用SPE，但是依然存在一定程度的破乳，且对于新剂型或复合药物的脂质体，无法达到检测需求!

SHIMSEN QK-p Kit 采用全新的聚集脂质体的方法，达到了对脂质体“零”破乳的前处理富集目的，无论是脂质体还是游离药物，回收率皆可达到98%以上!

该方法包对PEG修饰的核酸药物同样适用。

## 脂质体 “零”破乳 富集前处理方法包



内含：A液 x 1  
B液 x 1  
特殊表面处理96孔板 x 1  
全密封盖垫 x 4

# 更多精彩资料尽在SGLC电子书库

